

## Идентификация гибридного экземпляра *Polyommatus (Lysandra)* (Lepidoptera: Lycaenidae) с помощью генетических маркеров COI и ITS2

### Identification of the hybrid specimen of *Polyommatus (Lysandra)* (Lepidoptera: Lycaenidae) by genetic markers COI and ITS2

Д.И. Водолажский<sup>1</sup>, Б.В. Страдомский<sup>2</sup>, Г.В. Кузнецов<sup>3</sup>  
D.I. Vodolazhsky<sup>1</sup>, B.V. Stradomsky<sup>2</sup>, G.V. Kuznetsov<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Южный научный центр РАН, пр. Чехова, 41, Ростов-на-Дону 344006 Россия

<sup>2</sup>Ростовское отделение Русского энтомологического общества, а/я 3318, Ростов-на-Дону 344092 Россия

<sup>3</sup>Ул. Борьбы, 4–24, Волгоград 400006 Россия

<sup>1</sup>Southern Scientific Center of RAS, Chekhov str., 41, Rostov-on-Don 344006 Russia. E-mail: vodolazhski@ssc-ras.ru

<sup>2</sup>Rostov branch of Russian Entomologic Society, PO Box 3318, Rostov-on-Don 344092 Russia. E-mail: bvstr@yandex.ru

<sup>3</sup>Borby str., 4–24, Volgograd 400006 Russia. E-mail: gen-mash@mail.ru

**Ключевые слова:** *Polyommatus (Lysandra)*, *bellargus*, *coridon*, гибрид, гены COI и ITS2.

**Key words:** *Polyommatus (Lysandra)*, *bellargus*, *coridon*, hybrid, COI and ITS2 genes.

**Резюме.** Был обнаружен гибридный экземпляр *Polyommatus (Lysandra)*. Проведен сравнительный анализ двух несцепленных между собой генетических маркеров голубянок подрода *P. (Lysandra)*: митохондриального гена COI и ядерной нуклеотидной последовательности ITS2. Исследования показали, что гибридный экземпляр имеет ген COI, характерный для *P. (L.) coridon*, а ITS2 – для *P. (L.) bellargus*. Таким образом, обнаруженный экземпляр является гибридом *P. (L.) bellargus* × *P. (L.) coridon*.

**Abstract.** The authors studied a hybrid specimen of *Polyommatus (Lysandra)*. A comparative analysis of two independent genetic markers of specimens of subgenus *P. (Lysandra)*, the mitochondrial cytochrome oxidase I (COI) and the nuclear internal transcribed spacer 2 (ITS2), revealed that the hybrid specimen has the COI gene specific for *P. (L.) coridon* and ITS2 specific for *P. (L.) bellargus*. Therefore, the specimen is a hybrid of *P. (L.) bellargus* × *P. (L.) coridon*.

## Введение

При исследовании лепидоптерофауны Волгоградской области в промежуток с 2001 по 2009 год Г.В. Кузнецовым было обнаружено 5 экземпляров *Polyommatus (Lysandra)*, имеющих определенное морфологическое сходство с *P. (L.) corydonius* (Herrich-Schäffer, 1852) (Color plate 13: рис. 1). В то же время *P. (L.) bellargus* f. *polonus* Zeller, 1845, являющийся гибридом *P. (L.) bellargus* (Rottemburg, 1775) и *P. (L.) coridon* (Poda, 1761) [Higgins, Riley, 1978], также имеет аналогичный габитус. Для выяснения таксономической принадлежности нами было проведено изучение нуклеотидных последовательностей молекулярных маркеров (митохондриального – COI и ядерного – ITS2) одного из отмеченных выше экземпляров в сравнении

с *P. (L.) bellargus*, *P. (L.) coridon* и *P. (L.) corydonius*.

## Материал и методы

Все исследованные экземпляры *Polyommatus (Lysandra)* хранятся в музее Южного Научного Центра Российской Академии наук (ЮНЦ РАН, Ростов-на-Дону). Экземплярам присвоены идентификационные музейные номера.

### Материал:

- P. (L.)* hybrid: ♂, Russia: Starosel' e vill., Mikhajlovsky distr., Volgograd area, 19-Jul-2009, G. Kuznetsov (идентификационный номер ILL111);  
*P. (L.) coridon*: ♂, Russia: Belokalitvensky distr., Rostov-on-Don area, 8-Aug-2008, B. Stradomsky (ILL109)  
*P. (L.) bellargus*: ♂, Russia: Ust-Donetsky distr., Rostov-on-Don area, 26-Jun-2004, B. Stradomsky (ILL106);  
♀, Russia: Kislovodsk., Stavropol area, 2-Aug-2003, B. Stradomsky (ILL107);  
♂, Russia: Belokalitvensky distr., Rostov-on-Don area, 5-Jun-2004, B. Stradomsky (ILL108);  
*P. (L.) corydonius*: ♂, Russia: Gelendzhiksky distr., Krasnodar area, 26-Aug-2007, V. Shchurov (ILL101);  
♂, Russia: Gonachkhir (1900 m), Karachaj-Cherkesia, 6-Aug-2007, B. Stradomsky (ILL102);  
*P. (P.) icarus*: ♂, Russia: Dugino, Azov, Rostov-on-Don, 04-Jun-2006, B. Stradomsky (ILL041).

### Обработка материала и амплификация

Образцы тканей *P. (Lysandra)* охлаждали до –20°C и хранили в банке тканей отдела молекулярной биологии Института аридных зон Южного научного центра РАН вплоть до проведения экстракции ДНК.

Обработку образцов тканей *Lysandra*, амплификацию изучаемых участков ДНК, а также секвенирование амплифицированных фрагментов проводили аналогично процедурам, описанным нами ранее [Водолажский, Страдомский, 2008].

Для получения ПЦР-продуктов гена COI использовали следующие праймеры: прямой (PolF 5'- TAG CGA AAA TGA CTT TTT TCT A -3') и обратный (PolR2 5'- TTG CTC CAG STA ATA CAG GTA A -3'); для получения ПЦР-продуктов ядерной последовательности ITS2 применяли следующие праймеры: прямой (PiF 5'- GGG CCG GCT GTA TAA AAT CAT A -3') и

обратный (PiR 5'- AAA AAT TGA GGC AGA CGC GAT A -3').

Анализ первичных нуклеотидных последовательностей проводили с использованием программы BioEdit Sequence Alignment Editor версии 7.0.5.3 [Hall, 1999]. Отличия первичных нуклеотидных последовательностей определялись количественно с использованием метода максимальной парсимонии (Maximum Parsimony) и графически представлялись в виде дендрограммы. В качестве таксона сравнения был использован *P. icarus* (Rottemburg, 1775).

## Результаты и обсуждение

Проведенные исследования свидетельствуют о том, что изученный спорный экземпляр *P. (Lysandra)* имеет значительные отличия в нуклеотидных последовательностях как митохондриального маркера COI, так и ядерной последовательности ITS2 от экземпляров *P. (L.) corydonius* (Color plate 13: рис. 2). При этом исследуемая особь по строению гена COI была очень близка к *P. (L.) coridon* (Color plate 13: рис. 2). Известно, что митохондриальные гены наследуются по материнской линии, передаваясь через цитоплазму

яйцеклетки. Следовательно, материнская особь исследуемого экземпляра принадлежала к виду *P. (L.) coridon*. В то же время, по ядерной последовательности ITS2, передаваемой хромосомами, обсуждаемый экземпляр соответствовал *P. (L.) bellargus* (Color plate 13: рис. 2).

Таким образом, необходимо заключить, что обнаруженная особь неясной таксономической принадлежности является гибридом *P. (L.) bellargus* × *P. (L.) coridon* (= *polonus* Zeller, 1845).

## Литература

- Водолажский Д.И., Страдомский Б.В. 2008. Исследование филогенеза подрода *Polyommatus* (s. str.) Latreille, 1804 (Lepidoptera: Lycaenidae) с использованием маркеров мтДНК. Часть I // Кавказский энтомологический бюллетень. 4(1): 123-130.
- Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp. Ser. 41: 95-98.
- Higgins L.G., Riley N.D. 1978. Die Tagfalter Europas und Nordwestafrikas. Hamburg, Berlin. 377 p.

**Приложение 1.** Последовательности ДНК митохондриального гена COI изученных экземпляров *Polyommatus*.

**Appendix 1.** The COI DNA sequences from the studied specimens of *Polyommatus*.

Voucher No. ILL041: GenBank number FJ428822

Voucher No. ILL101: GenBank number FJ943965

Voucher No. ILL102: GenBank number FJ943962

Voucher No. ILL106

```
1 TGAATTGA GCGGGAATAG TGGGAACATC CCTAAGAATT TTAATTCGTA TAGAATTAAG
61 AACCCSTGGA TCTTTAAATG GGGATGATCA AATTTATAAT ACTATTGTTA CAECTCATGC
121 ATTTATATA ATTTTTTTTA TAGTATAC TATTATAAAT GGAGGATTTG GCAACTGAAT
181 AGTACSTTTA ATATTAGGGG CACCTGATAT AGCATTCCTT CGATTAATA ATATAAAT
241 TTGATTTATA CTSCATCAT TAATACCTTT AATTTCTAGA AGAATTGTAG AAAATGGAAC
301 AGGAACAGGA TGAACAGTTT ACCSSCCACT TTCTATCTAA ATTGCTCATA GAGGATCATC
361 TGTAGATTTA GCAATTTTCT CACTTCATTT AGCTGGAATT TCTTCAATTT TAGGAGCTAT
421 TAACSTTTAT ACAACTATCA TTAATATACG AGTAAATAAT TTATCTTTTG ATCAAATATC
481 ATTAATTTAT TGAGCGGTAG GAATTACAGC AT
```

Voucher No. ILL107

```
1 TGAATTGA GCGGGAATAG TGGGAACATC CCTAAGAATT TTAATTCGTA TAGAATTAAG
61 AACCCSTGGA TCTTTAAATG GGGATGATCA AATTTATAAT ACTATTGTTA CAECTCATGC
121 ATTTATATA ATTTTTTTTA TAGTATAC TATTATAAAT GGAGGATTTG GCAACTGAAT
181 AGTACSTTTA ATATTAGGGG CACCTGATAT AGCATTCCTT CGATTAATA ATATAAAT
241 TTGATTTATA CTSCATCAT TAATACCTTT AATTTCTAGA AGAATTGTAG AAAATGGAAC
301 AGGAACAGGA TGAACAGTTT ACCSSCCACT TTCTATCTAA ATTGCTCATA GAGGATCATC
361 TGTAGATTTA GCAATTTTCT CACTTCATTT AGCTGGAATT TCTTCAATTT TAGGAGCTAT
421 TAACSTTTAT ACAACTATCA TTAATATACG AGTAAATAAT TTATCTTTTG ATCAAATATC
481 ATTAATTTAT TGAGCGGTAG GAATTACAGC AT
```

Voucher No. ILL108

```
1 TGAATTGA GCGGGAATAG TGGGAACATC CCTAAGAATT TTAATTCGTA TAGAATTAAG
61 AACCCSTGGA TCTTTAAATG GGGATGATCA AATTTATAAT ACTATTGTTA CAECTCATGC
121 ATTTATATA ATTTTTTTTA TAGTATAC TATTATAAAT GGAGGATTTG GCAACTGAAT
181 AGTACSTTTA ATATTAGGGG CACCTGATAT AGCATTCCTT CGATTAATA ATATAAAT
241 TTGATTTATA CTSCATCAT TAATACCTTT AATTTCTAGA AGAATTGTAG AAAATGGAAC
301 AGGAACAGGA TGAACAGTTT ACCSSCCACT TTCTATCTAA ATTGCTCATA GAGGATCATC
361 TGTAGATTTA GCAATTTTCT CACTTCATTT AGCTGGAATT TCTTCAATTT TAGGAGCTAT
421 TAACSTTTAT ACAACTATCA TTAATATACG AGTAAATAAT TTATCTTTTG ATCAAATATC
481 ATTAATTTAT TGAGCGGTAG GAATTACAGC AT
```

Voucher No. ILL109: GenBank number FJ943961

Voucher No. ILL111

```
1 TGAATTGA GCGGGAATAG TGGGAACATC CCTAAGAATT TTAATTCGTA TAGAATTAAG
61 AACCCSTGGA TCTTTAAATG GGGATGATCA AATTTATAAT ACTATTGTTA CAECTCATGC
121 ATTTATATA ATTTTTTTTA TAGTATAC TATTATAAAT GGAGGATTTG GCAACTGAAT
181 AGTACSTTTA ATATTAGGGG CACCTGATAT AGCATTCCTT CGATTAATA ATATAAAT
241 TTGATTTATA CTSCATCAT TAATACCTTT AATTTCTAGA AGAATTGTAG AAAATGGAAC
301 AGGAACAGGA TGAACAGTTT ACCSSCCACT TTCTATCTAA ATTGCTCATA GAGGATCATC
361 TGTAGATTTA GCAATTTTCT CACTTCATTT AGCTGGAATT TCTTCAATTT TAGGAGCTAT
421 TAACSTTTAT ACAACTATCA TTAATATACG AGTAAATAAT TTATCTTTTG ATCAAATATC
```

**Приложение 2.** Последовательности ДНК ядерного гена ITS2 изученных экземпляров *Polyommatus*.

**Appendix 2.** The ITS2 DNA sequences from the studied specimens of *Polyommatus*.

Voucher No. ILL041: GenBank number GQ885165

Voucher No. ILL101

```
1 GCCGCTCCC GTGCGGTCCG TTCAAAAATA GACATAAATA TAATATAACG TTACGTGTGG
61 TGTGGTGTGT GTGTACGGTA GCGCGCTCGC GTCCGGCAGC TGCCGGCTCT CCCACCGCAG
121 CTCCTGTGAAG GTGAAAAAAT TGCGAGAGCG ATTATCGGTG AGCGGGGCGT GCACGACAGT
181 CGAAGTGTGT TCGTGCAGCG GCGCAGAAATG CGCTCGCTAC TCTTTGTTCG TTCTGTGGCA
241 AGCGCCGACC ACCGTGCGAAA ACACTGGTTA TGTATACAGA AGTAGGCGGCA
301 CTCGACGTCC GAAGGGCGCG TCGTGCAGCG CGACGTACCG ATTTAGTTCCG GTCGCGGA
```

Voucher No. ILL102

```
1 GCGCACGGCG GTCGAACAAAT TGATGGTTCC GGCCGGTGTA GAGCGCGCCG CGCTGTGTGT
61 GCGGCTCTTT CCGCACGCGC GCGGCTCCTT GTCCGGCAGC TTCAAAAATA GACATAAATA
121 TAATATAACG TTACGTGTGG TGTAGTGTGT GTGTACGGTA GCGCGCTCGC GTCGCGGAGG
181 TGCGGCGCTC CCCACCGCAG CTCCGTGAAG GTGAAAAAAT TGCGAGAGCG ATTATCGGTG
241 AGCGGGGCGT GCACGACAGT CGAAGTTTGT TCGTGCAGCG GCGCAGAAATG CGCTCGCTAC
301 TCGTTGTTCG TTCTGTGGCA AGCGCCGACC ACCGTGCGAAA ACACTGGTTA TGTATACAGA
361 ATTAACGAAC AGTAGGCGGA CTCGACGTCC GAAGGGCGCG TCGTGCAGCG CGACGTACCG
421 ATTTGATTTT
```

Voucher No. ILL108

```
1 ACTGTTCTG GTGCTGCTCG TCTCAGCAGC TCGAACAAAT GACGGTTCGG GCGGTTGTAG
61 AGCGCGCGCG TGTGTGTGCG GGTTCGTCCG CACGCGCGCC GCCTCCCGTG CGGTCCGTTG
121 AAAAATAGAC ATAAATGTAA TATAAGTTTA CGTGTGTGTG GGTGTGTGTG TACGGTAGCG
181 CGCTCGGCTC GCGCAGCTGC GCGGCTCCCG ACCGACGCTC CGTGAAGGTG AAAAGTTTTG
241 CGAGAGCGAT TATCGGTGAG CCGGGGCTGC ACCGACGCTC AACTTGTGTG GTCGACGCGC
301 GCAGAAATGG CTGCGTACT GTTCGTTCTG TCGCAACGCG GCACCCAGCT CGAAACAACAT
361 GGTATGTGTA TACGAATTA GAACAGTAG GCGCACTGCA CGTCCGAAGG GCGGCTGCTC
421 GACGCCGACG TACCGATTGA TTTCGTTCCG GGAGCGGAG TCGTTGCGCT GACGGA
```

Voucher No. ILL109

```
1 ACGGCGCAGC GCGTCGAACA ATTGACGGTT GCGGGCGGTG TAGAGCGCCG CGCTGTGTGT
61 GCGGTTCTGT CCGTCCGGCT CGTTCAAAA TAGACATAAA TATAATAATA CGTTACGTGT
121 TGTGTGTGTG TGTGTACGG TAGCGGCTC CGCTCGCGCA GTCGCGCCGC TCCCAACGGA
181 CGCTCGTGA AGGTGAAAAA TTTGCGAGAG CGATTATCGG TGAGCGGGGG GTCGACGCGC
241 GTCGCAACTG TGTCTGCGAC GCGCGCAGAA TCGCTGCGCT ACTCGTTCGT TCGTTCGAA
301 CGCGCCAGCA CCGTCAAAA CACTGGTTAT GTTATACGAA TTAACGAACA GTAGCGCGAC
361 TCGACGTCGG AAGGGCGCGT GTCGACGCC GACGTACCGA TTGATTTCCG TCCGCGAGG
421 GGAGTCTGTT CGCTGACGGA
```

Voucher No. ILL111

```
1 ACTGTTCTG GTGCTGCTCG TCTCAGCAGC TCGAACAAAT GACGGTTCGG GCGGTTGTAG
61 AGCGCGCGCG TGTGTGTGCG GGTTCGTCCG CACGCGCGCC GCCTCCCGTG CGGTCCGTTG
121 AAAAATAGAC ATAAATGTAA TATAAGTTTA CGTGTGTGTG GGTGTGTGTG TACGGTAGCG
181 CGCTCGGCTC GCGCAGCTGC GCGGCTCCCG ACCGACGCTC AACTTGTGTG GTCGACGCGC
241 GCAGAAATGG CTGCGTACT GTTCGTTCTG TCGCAACGCG GCACCCAGCT CGAAACAACAT
301 GGTATGTGTA TACGAATTA GAACAGTAG GCGCACTGCA CGTCCGAAGG GCGGCTGCTC
421 GACGCCGACG TACCGATTGA TTTCGTTCCG GGAGCGGAG TCGTTGCGCT GACGGA
```

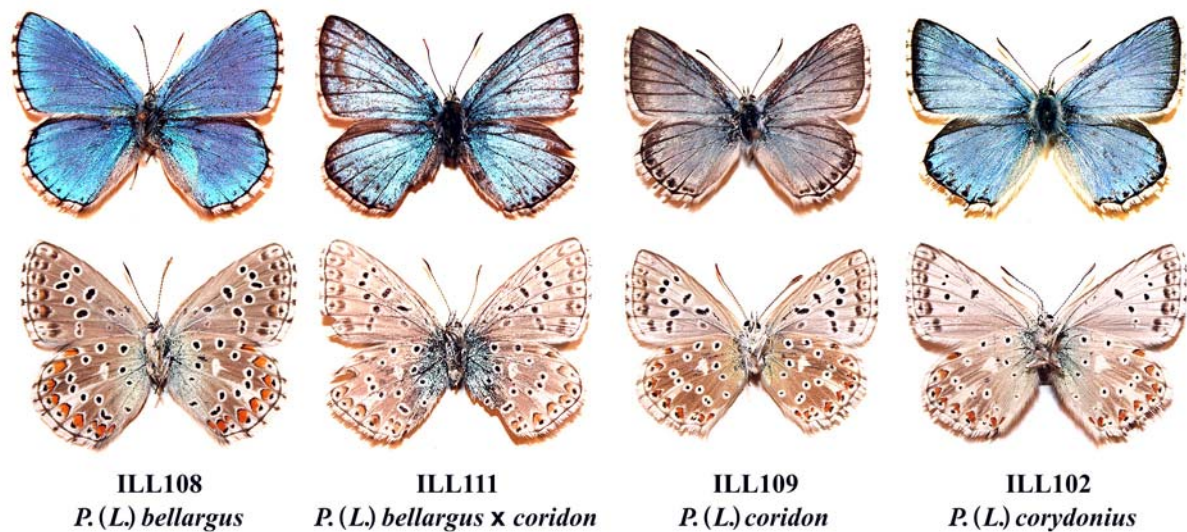


Рис. 1. Изученные экземпляры *Polyommatus (Lysandra)*, самцы, верхняя и нижняя сторона: *P. (L.) bellargus*, гибрид *P. (L.) bellargus* x *P. (L.) coridon*, *P. (L.) coridon*, *P. (L.) corydonius*.

Fig. 1. Studied specimens of *Polyommatus (Lysandra)*, males, upperside and underside: *P. (L.) bellargus*, hybrid of *P. (L.) bellargus* x *P. (L.) coridon*, *P. (L.) coridon*, *P. (L.) corydonius*.

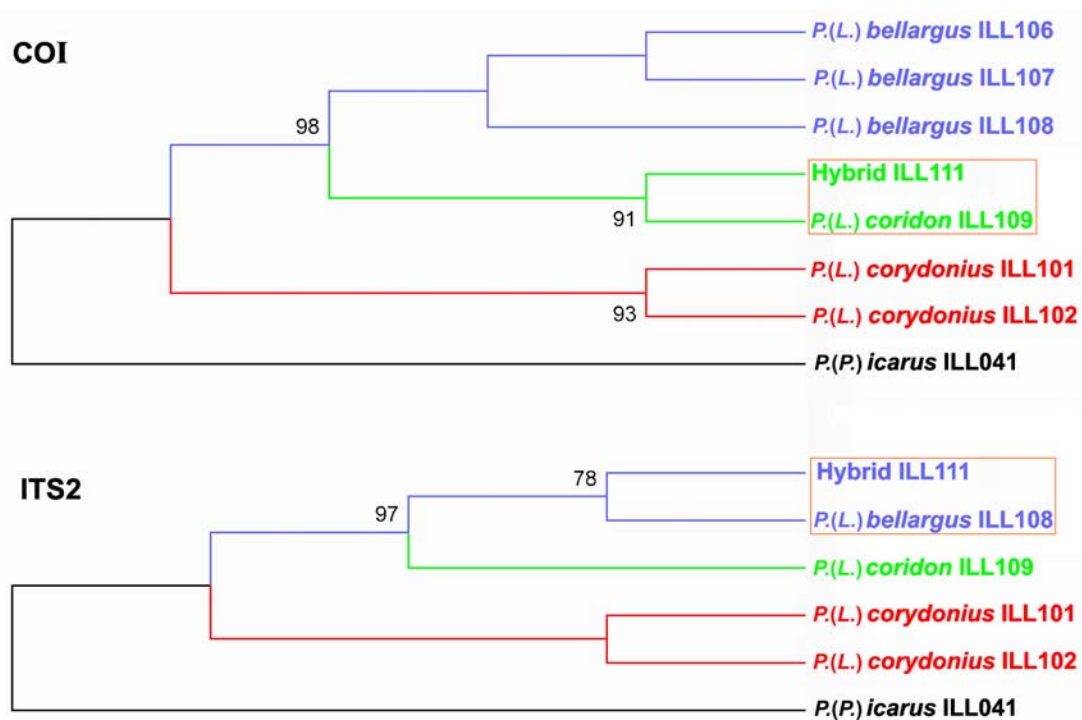


Рис. 2. Дендрограмма гаплотипов *Polyommatus (Lysandra)* на основе анализа митохондриального гена COI и ядерной нуклеотидной последовательности ITS2 с использованием метода максимальной парсимонии.

Fig. 2. The tree of *Polyommatus (Lysandra)* haplotypes based on analysis of the COI mitochondrial gene and of the nuclear ITS2 nucleotide sequence with the use of the maximum parsimony method.